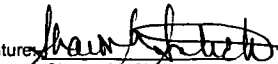




I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service with sufficient postage as First Class Mail, in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date shown below.

Dated: December 9, 2004

Signature: 
Sharon M. Sinfich

Docket No.: 01017/40451C

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of: Brockhaus et al.

Application No.: 08/444,791

Group Art Unit: 1644

Filed: May 19, 1995

Examiner: R. Schwadron, Ph.D.

For: Human TNF Receptor

DECLARATION UNDER 37 C.F.R. § 1.132 OF DR. WERNER LESSLAUER

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

I, Dr. Werner Lesslauer, do hereby declare and state as follows:

1. I am a co-inventor of the invention claimed in the above-referenced application. I am familiar with the contents of the above-identified U.S. patent application and I am providing this declaration to make available to the Examiner additional data relevant to the invention claimed.

2. Attached hereto as Exhibit A is an affidavit in German that I supplied to the European Patent Office regarding counterpart European patent application no. 99100703.0 (European patent publication no. EP 0 939121 B1).

3. Attached hereto as Exhibit B is an English translation of the affidavit. I hereby confirm my belief in the truth of the statements in this English translation for submission to the U.S. Patent and Trademark Office in the above-identified application.

4. The experiments described in Exhibits A and B compared the activity of a recombinant soluble fragment of the human p75 TNF receptor (p75sTNFR) to the activity of a recombinant immunoglobulin (Ig) fusion protein of p75sTNFR referred to as "p75sTNFR/IgG." The recombinant Ig fusion protein consists of the soluble extracellular domain of the 75 kD TNF receptor, the cloning of which is described in the specification in Example 8, fused to a fragment of the heavy chain of a human IgG3 molecule which is missing the CH1 domain and contains the hinge, CH2 and CH3 domains. This p75 fusion protein is described, *inter alia*, at page 11, lines 1-14.

Application No.: 08/444,791
Declaration of Werner Lesslauer

5. I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true, that all statements made on information and belief are believed to be true, and that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both (18 U.S.C. § 1001), and may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Date December 3, 2004 Werner Lesslauer
Dr. Werner Lesslauer

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Werner Lesslauer, Dr. med., Dr. phil. nat., Privatdozent, zur Zeit Gastprofessor der Yale University School of Medicine, Dept. Epidemiology & Public Health and Immunobiology, 60 College Street, New Haven, CT 06520-8034, USA, mache die folgende eidesstattliche Erklärung.

Vom Jahr 1987 bis Ende Juni 1999 war ich in den Biologie-Abteilungen der Zentralen Forschungseinheit und der Forschungsabteilung Zentrales Nervensystem der Hoffmann -La Roche AG in Basel (Schweiz) tätig, zuletzt als wissenschaftlicher Experte verantwortlich für die Leitung verschiedener Forschungsgruppen in den Bereichen der Protein-, Zell- und Molekularbiologie. Seit Anfang September 1999 bin ich als Gastprofessor an der Universität Yale tätig. Meine gegenwärtigen Forschungsprojekte betreffen von pro-inflammatorischen Cytokinen wie zum Beispiel TNF α oder Lymphotoxin (gemeinsam als "TNF" bezeichnet) vermittelte interzelluläre Kommunikation, die von den zellulären Rezeptoren dieser Cytokine aktivierten intrazellulären Signaltransduktions-Mechanismen, und die durch solche Prozesse im Rahmen von Entzündungsphänomenen ausgelöste organoide Transformation von tertiären lymphoiden Geweben. Im weiteren befasste ich mich mit der Rolle von Cytokin-aktivierter Signaltransduktion in kognitiven Funktionen. Diese Arbeiten stellen somit eine Weiterführung der bei Hoffmann-LaRoche verfolgten wissenschaftlichen Interessen dar. Ein Teil meines Verantwortungsbereichs bei der Hoffmann -La Roche AG umfasste die Entwicklung von Verfahren zur rekombinanten Expression und zum Reinigen und Testen von Proteinen, wie beispielsweise den löslichen TNF - Rezeptoren ("sTNFR") und p75TNF - Rezeptor - Immunoglobulin - Fusionsproteinen ("p75sTNFR/IgG"). Diese Rezeptor-Fusionsproteine wurden durch die Fusion der löslichen extrazellulären Domäne des p75TNF - Rezeptors, p75sTNFR, die selbst TNF bindet, mit einem Fragment der schweren Kette eines humanen IgG - Moleküles, das praktisch dem Fc-Teil entspricht, mit biotechnologischen Verfahren konstruiert.

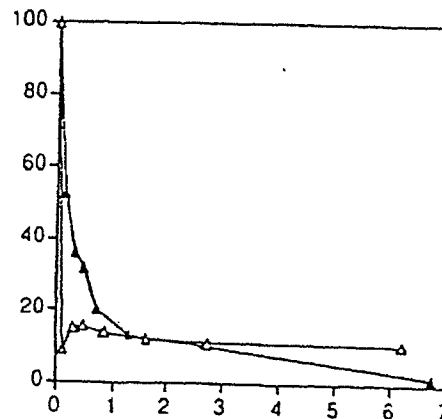
Weiterhin bin ich einer der Miterfinder der vorliegenden Europäischen Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 99.100703.0, die solche p75sTNFR/IgG beansprucht. Ich war sowohl an der Erfindung, der Herstellung und dem Testen dieser Fusionsproteine beteiligt.

Gegenstand der vorliegenden eidesstattlichen Erklärung sind die im Vergleich zu der löslichen extracellulären Domäne des p75TNF - Rezeptors p75sTNFR überraschenden Eigenschaften von p75sTNFR/IgG. Zum Zeitpunkt, in dem p75sTNFR/IgG erstmals konstruiert, exprimiert und getestet wurde, gab es Vorstellungen über die räumliche Struktur von TNF α . In dem betreffenden Proteinkristall lag TNF α als Trimer vor und es wurde vermutet, dass dies nicht allein eine Folge der Kristallisierung war, sondern dass das TNF α -Trimer auch die biologisch aktive Form ist. Die räumliche Geometrie der Rezeptor-Bindungsstelle war jedoch unbekannt. Es wäre durchaus möglich gewesen, dass die Fusion mit IgG - Fragmenten ein räumliches Gebilde geschaffen hätte, das wohl TNF-Rezeptorsequenzen enthalten hätte, das aber wegen seiner räumlichen Struktur TNF α überhaupt nicht binden konnte.

Die rasche Elimination und daher kurze Halbwertszeit von p75sTNFR in vivo machte jedoch eine Vergrößerung des Moleküls unerlässlich. Es ist nicht auszuschliessen, dass man sogar eine gewisse Einbusse an Bindungsaktivität in Kauf genommen hätte, um nur eine längere Halbwertszeit und Bioverfügbarkeit zu erreichen. Ueberraschend zeigte das Fusionskonstrukt

jedoch sogar eine sehr gute Bindungsaktivität. Zudem fand sich eine unerwartet höhere kinetische Stabilität, und eine überraschend bessere Inhibierung der Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ in biologischen Zellkultur-Testen.

Die höhere kinetische Stabilität von p75sTNFR/IgG lässt sich durch den folgenden Versuch I (siehe Figur) veranschaulichen: p75sTNFR/IgG und p75sTNFR werden in separaten Reaktionsgefäßen mit radioaktivem $\text{TNF}\alpha$ inkubiert, sodass die jeweiligen molekularen Spezies im Komplex mit markiertem $\text{TNF}\alpha$ vorliegen. Diese Komplexe werden sodann in neue Lösungen überführt, die einen Ueberschuss an unmarkiertem $\text{TNF}\alpha$ enthalten. Wie allgemein in jeder Bindungsstudie wurde auch hier gefunden, dass $\text{TNF}\alpha$ mit einer für den jeweiligen Reaktionspartner spezifischen Kinetik an p75sTNFR/IgG und p75sTNFR andockt und wieder dissoziiert. In zeitabhängiger Weise wurde nun die Austauschrate von kaltem $\text{TNF}\alpha$ mit dem jeweils an p75sTNFR/IgG und p75sTNFR gebundenen markierten $\text{TNF}\alpha$ bestimmt. Eine genaue Beschreibung der experimentellen Technik dieses Versuches wird im Annex gegeben. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der folgenden Figur dargestellt. In dieser ist auf der waagrechten Achse die Zeit in Stunden und auf der senkrechten Achse der Anteil an spezifisch gebundenen radioaktiv markiertem $\text{TNF}\alpha$ in % angegeben. Nichtgefüllte Dreiecke stehen für p75sTNFR und gefüllte Dreiecke stehen für p75sTNFR/IgG .



Dieser Figur kann man klar entnehmen, dass am von der Versuchsanordnung hier frühest möglichen ersten Messzeitpunkt, d.h. nach etwa sechs Minuten, das gesamte an p75sTNFR gebundene $\text{TNF}\alpha$ bereits vollständig ausgetauscht worden war. Hingegen waren bei p75sTNFR/IgG zu diesem Zeitpunkt erst etwa die Hälfte der markierten $\text{TNF}\alpha$ Moleküle ausgetauscht worden. Dies bedeutet, dass $\text{TNF}\alpha$ mit einer wesentlich langsameren Kinetik von p75sTNFR/IgG dissoziiert als von p75sTNFR . Damit wird die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ durch

p75sTNFR/IgG wesentlich besser neutralisiert als durch p75sTNFR, da das freigesetzte TNF α wieder biologische Aktivität entfalten kann. Diese Eigenschaft lässt das p75sTNFR/IgG Fusionskonstrukt ganz unabhängig von der durch die Vergrößerung des Moleküles bedingten langsameren Elimination in vivo als potenteres pharmakologisches Agens erscheinen.

Diese unvorhersehbare Eigenschaft korreliert auch mit einer unerwartet besseren Inhibierung der Wirkung von TNF durch p75sTNFR/IgG gegenüber p75sTNFR, wie der folgende Versuch II (siehe Tabelle) verdeutlicht. Dabei handelt es sich um einen Versuch in Zellkultur mit weissen, sog. mononukleären Blutzellen, die aus humanem Blut isoliert worden waren. Diese Zellen lassen sich in Kultur durch Behandlung mit mitogenen Substanzen zur Proliferation stimulieren, die dadurch zu Stande kommt, dass einzelne Zellgruppen in der Kultur durch die Mitogen-Behandlung ausgelöst sekundär Wachstumsfaktoren produzieren und in das Kulturmedium abgeben. Der bekannteste dieser Wachstumsfaktoren ist das wohlbekannte Interleukin-2. Daneben hat es sich gerade durch Untersuchungen, die durch die Verfügbarkeit von Reagentien wie p75sTNFR/IgG und p75sTNFR ermöglicht wurden, gezeigt, dass unter anderem auch TNF in den späteren Phasen solcher Kulturen eine zellwachstumsfördernde Aktivität entfaltet. Die Eigenschaft von p75sTNFR/IgG und von p75sTNFR, TNF zu binden und zu neutralisieren, erlaubt nun, diese proliferative Aktivität von TNF zu inhibieren. Das Ergebnis eines derartigen Versuchs ist in der untenstehenden Tabelle festgehalten. In diesem Versuch wurde die Zellproliferation durch den Einbau der radioaktiv markierten Vorstufe Thymidin in die zelluläre DNA gemessen (siehe Annex).

Verwendete Konstrukte

Inhibierung des Einbaus von
Deuterium - Thymidin (Tag 7)

p75sTNFR	68 %
p75sTNFR/IgG	86 %

Aus dieser Tabelle ist klar ersichtlich, dass das Fusionsprotein p75sTNFR/IgG gegenüber der löslichen extrazellulären Domäne p75sTNFR eine ueberraschend bessere Neutralisierung der TNF Aktivität, d.h. der Proliferation der Blut- Zellen in Kultur, bewirkt.

Eine derart potentere neutralisierende Wirkung ist in pathologischen Zuständen, die durch zu starke TNF α Freisetzung mitverursacht werden, sehr erwünscht. Es ist hier wichtig, daran zu erinnern, dass TNF α zwar in vielen pathologischen Zuständen ein wichtiger Faktor der Wirtsabwehr ist und damit für den Organismus eine wichtige positive Funktion hat. TNF α hat jedoch ein Janus-Gesicht, und entfaltet in anderen Situationen - sei es durch zu starke Expression, Expression am falschen Ort, oder zur falschen Zeit - krankmachende Wirkungen. Da man bereits zum Zeitpunkt der vorliegenden Anmeldung annahm, dass bei einer Reihe von Krankheiten, wie beispielsweise der rheumathoiden Arthritis, TNF α in der Entstehung der Entzündung und in der Gewebs-Zerstörung in den Gelenken eine Rolle als krankmachender

Mediator spielt, sollten Substanzen welche die Wirkung von TNF α inhibieren auch bei der Behandlung solcher Krankheiten als pharmazeutisch wirksame Substanzen einsetzbar sein. Diese Gedankengänge haben später durch die erfolgreiche Einführung eines p75sTNFR-IgG Präparates in die Therapie der rheumatoiden Arthritis ihre volle Bestätigung gefunden.

ANNEX

Versuch I:

Man inkubiert 1.4 $\mu\text{g/ml}$ des p75sTNFR/IgG bzw. 0.75 $\mu\text{g/ml}$ des p75sTNFR in 1 ml Phosphat- gepufferter Kochsalzlösung ("PBS" enthaltend 1% foetales Kälberserum) mit 25 ng/ml ^{125}I -markiertem TNF α , das in seiner Rezeptor-Bindung von unmarkiertem TNF α nicht zu unterscheiden war. Zum Zeitpunkt Null setzt man dann einen 1000-fachen Überschuss nichtmarkiertes TNF α dazu und entnimmt zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils kleine Proben von 60 μl . Diese Proben gibt man in Millipore 0.22 μm MC Filtereinheiten die bereits 20 μl einer 50%igen Suspension von 'Protein G Sepharose 4 Fast Flow Beads' ("Sepharose-Kugeln") in PBS mit 1% fötalem Kälberserum enthalten. Damit p75sTNFR/IgG bzw. p75sTNFR an die Sepharose Kugel binden können, wurden diese mit einem gegen den TNF-Rezeptor gerichteten Antikörper vorbeschichtet (1 mg Antikörper/ ml Sepharose-Kugeln). Nach Inkubation während 4 min. unter Schütteln wurden die Filtrationseinheiten zentrifugiert (13000 rpm, 30 sek.), und damit das ungebundene TNF α abgetrennt, während das an p75sTNFR-IgG bzw. p75sTNFR gebundene TNF α auf den Sepharose-Kugeln haften blieb. Damit wurde es möglich, die am jeweiligen Zeitpunkt noch am p75sTNFR-IgG und p75sTNFR gebundene Menge von radioaktiv markiertem TNF α zu messen. Nicht-spezifische Bindung wurde in derselben Weise in Abwesenheit von p75sTNFR/IgG bzw. p75sTNFR bestimmt. 100%ige Bindung wurde in Abwesenheit von nichtmarkiertem TNF α bestimmt. Die Versuche wurden bei 25°C durchgeführt.

Versuch II

Mononukleäre Zellen wurden aus frischem venösen Human- Blut von gesunden Spendern mittels eines Ficoll Paque- Dichtegradienten (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in einem Zitratpuffer isoliert. Diese weissen Blut - Zellen wurden zweimal mit einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung gewaschen und bei einer Dichte von 1.0×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 Kulturmedium, das mit 10%igem hitzeinaktivierten fötalem Kälberserum, 100 Einheiten/ml Penizillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 2 mM Glutamin supplementiert worden war, kultiviert. Für den Proliferationstest wurden die Zellen in Flachbodenmikrotiterplatten (NUNC LON 1-67008: Roskilde, Dänemark) in 100 μl Medium kultiviert. Die Zellen wurden, mit Phytohaemagglutinin (Wellcome, Dartford, England) bei zuvor bestimmten optimalen Konzentrationen im Bereich von 0.5 bis 1.5 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Zum Startzeitpunkt der Kultur (Tag 0) wurde p75sTNFR/IgG bzw p75sTNFR bis zu eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Das Kulturmedium wurde nach 3, 4 und 6 Tagen aufgefrischt. Die

Zellproliferation wurde nach 7 Tagen gemessen, wobei den Kulturen sechs Stunden vor dem Ernten mit einem LKB Zellenmeter $1\mu\text{Ci/Kultur}$ Methyl- 3H -Thymidin (1mCi/ml Amersham, Buckinghamshire, England) zugesetzt wurde. Die in die Zellen eingebaute Radioaktivität wurde in einem Betaplatten-Flüssig Szintillationszähler (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gemessen. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert von drei Kulturen dar.

Nas Haven, 8. Oktober 2001

W. Leu Kauer

Exhibit B

Affidavit

I, Werner Lesslauer M.D., Ph.D., Private Lecturer, presently Visiting Professor at the Yale University School of Medicine, Dept. Epidemiology & Public Health and Immunobiology, 60 College Street, New Haven, CT 06520-8034, USA, hereby file an affidavit in lieu of an oath:

From 1987 to the end of June of 1999, I was working in the Biology Departments of the Central Research Unit and the Research Department, Central Nervous System, of Hoffmann-LaRoche AG in Basel (Switzerland); toward the end of my activity, I worked as scientific expert and was responsible for the management of different research groups in the fields of protein, cell and molecular biology. At the beginning of September 1999, I began my work as a Visiting Professor at Yale University. My current research projects relate to the intercellular communication mediated by pro-inflammatory cytokines, such as TNF α or lymphotoxin (jointly called "TNF"), the intracellular signal transduction mechanisms activated by the cellular receptor of these cytokines, and the organoid transformation of tertiary lymphoid tissue triggered by such processes in the context of inflammatory phenomena. In addition, I am also working on the role of cytokine-activated signal transduction in cognitive functions. Thus, my current research extends the scientific interests I pursued at Hoffmann-LaRoche. As part of my responsibilities at HoffmannLaRoche AG, I worked on the development of methods for the recombinant expression and for the purification and testing of proteins, such as the soluble TNF receptors ("sTNFR") and p75TNF receptor immunoglobulin fusion proteins ("p75sTNFR/IgG"). These receptor fusion proteins were constructed by means of the fusion of the soluble extracellular domain of the p75TNF receptor, p75sTNFR, which itself bind TNF, and a fragment of the heavy chain of a human IgG molecule which practically corresponds to the Fc portion, using biotechnological methods.

I am also one of the co-inventors of the present European Patent Application with the Application Number 99.100703.0 which claims such p75sTNFR / IgGs. I participated both in the invention and in the production and testing of these fusion proteins.

The subject matter of the present affidavit in lieu of an oath concerns the properties of p75s TNFR / IgG which are surprising when comparing them to those of the soluble extracellular domain of the p75TNF receptor, p75sTNFR. At the time when p75sTNFR / IgG was first constructed, expressed, and tested, knowledge of the spatial structure of TNF α was available. In the relevant protein crystal, TNF α was present in the form of a trimer, and it was

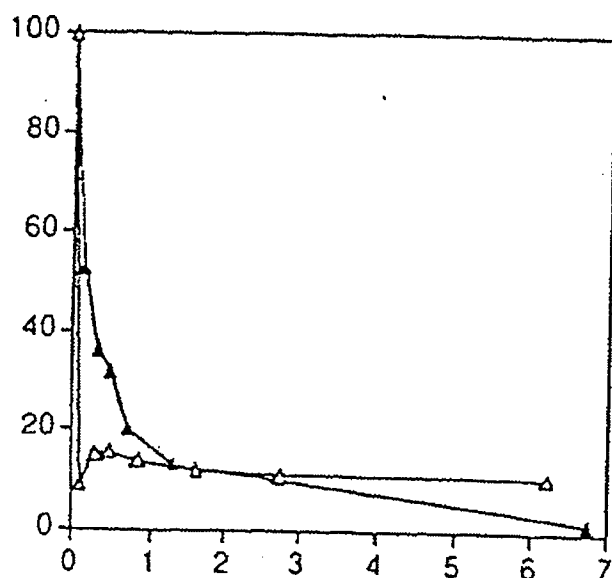
Exhibit B

hypothesized that this was not only a result of the crystallization but that instead, the TNF α trimer is the biologically active form as well. But the spatial geometry of the receptor binding site was unknown. Thus, it could have been possible that the fusion with IgG fragments created a spatial structure that would have contained TNF receptor sequences but which, due to its spatial structure, was completely unable to bind TNF α .

The rapid elimination and thus the short half-life of p75sTNFR in vivo, however, made it imperative to enlarge the molecule. It cannot be excluded that there might even have been a willingness to accept a certain decrease of the binding activity only to obtain a longer half-life and greater bioavailability. Surprisingly, however, the fusion construct obtained even had an excellent binding activity. In addition, an unexpectedly higher kinetic stability and a surprisingly improved inhibition of the effect of TNF in biological cell culture tests were discovered as well.

The higher kinetic stability of p75sTNFR / IgG can be illustrated on the basis of the following experiment I (see figure): In separate reaction vessels, p75sTNFR / IgG and p75s TNFR are incubated with radioactively labeled TNF α so that the respective molecular species are present in the complex with labeled TNF α . These complexes are subsequently transferred into new solutions which contain an excess of unlabeled TNF α . As is generally the case in any binding study, it was found here as well that TNF α binds to and dissociates itself from p75sTNFR / IgG and p75sTNFR with kinetics specific to the respective reaction participant. Next, the exchange rate of cold TNF α with the labeled TNF α bound to p75sTNFR / IgG and p75sTNFR was determined as a function of time. A detailed description of the experimental technique of this test can be found in the appendix. The results of these experiments are illustrated in the figure below. In this figure, the time in hours is plotted on the horizontal axis, and the percentage of specifically bound radioactively labeled TNF α in % is plotted on the vertical axis. Unfilled triangles stand for p75sTNFR and filled triangles stand for p75sTNFR / IgG.

Exhibit B



This figure indicates very clearly that, based on the experimental set-up, at the earliest possible first time of taking a reading, i.e., after approximately six minutes, the labeled TNF α bound to p75sTNFR had been completely exchanged. For p75sTNFR / IgG, on the other hand, at that point in time, only approximately half of the labeled TNF α molecules had been exchanged. This means that TNF α dissociated with considerably slower kinetics from p75sTNFR / IgG than it does from p75sTNFR. Thus, the effect of TNF α is considerably better neutralized by p75sTNFR / IgG than by p75sTNFR, since the liberated TNF α , is able to become biologically active again. This property, quite apart from the elimination *in vivo* which is slower as a result of the enlargement of the molecule, makes the p75sTNFR / IgG fusion construct a more potent pharmacological agent.

As experiment II below (see table) illustrates, this unforeseeable property also correlates with an unexpectedly superior inhibition of the effect of TNF by p75sTNFR / IgG as compared to p75sTNFR. This test is carried out in a cell culture with white, so-called mononuclear, blood cells which had been isolated from human blood. In culture, these cells can be made to proliferate by treating them with mitogenic substances, which proliferation is propagated by the fact that individual cell groups in the culture produce growth factors which are secondarily triggered by the mitogen treatment and which are released into the culture medium. The best known of these growth factors is the well-known interleukin-2. In addition, tests which were made possible because of the availability of reagents, such as p75sTNFR / IgG and p75sTNFR, had shown that, among other things, TNF also develops a cell growth-promoting activity in the later phases of such cultures. The property of p75sTNFR / IgG and of p75sTNFR to bind and neutralize TNF makes it possible to inhibit this proliferative activity of TNF. The result of such a test is summarized in the table below. In this test, the cell proliferation was measured by

Exhibit B

incorporation of the radioactively labeled precursor thymidine into the cellular DNA (see Annex).

<u>Construct Used</u>	<u>Inhibition of the incorporated ³H-Thymidine (day 7)</u>
p75sTNFR	68%
p75sTNFR / IgG	86%

This table illustrates clearly that compared to the soluble extracellular domain p75sTNFR, the fusion protein p75sTNFR / IgG causes a surprisingly superior neutralization of the TNF activity, i.e., the proliferation of the blood cells in culture.

This more highly potent neutralizing effect is very desirable in pathological conditions that are caused by an excessively high TNF α release. In this context, it is important to keep in mind that, although in many pathological conditions TNF α is an important factor of the host's defense and thus plays an important positive role within the organism, TNF α has two faces and, in different situations, develops effects that cause disease -- either by an excessively high expression, or an expression in the wrong site or at the wrong time. Since it was assumed as early as at the time of the present application that in a number of diseases, such as rheumatoid arthritis, TNF α plays a role as a disease-causing mediator in the development of the inflammation and in the destruction of the tissue in the joints, the next step was to assume that it should be possible to use substances that inhibit the effect of TNF α as pharmaceutically effective substances in the treatment of such diseases. Later on, these hypotheses were fully corroborated when a p75sTNFR-Ig/G preparation was successfully introduced into the therapy of rheumatoid arthritis.

Appendix

Experiment I:

1.4 μ g / mL of p75TNFR / IgG and 0.75 μ g / mL of p75sTNFR were separately incubated in 1 mL of phosphate-buffered physiological saline solution ("PBS" containing 1% fetal calf serum) with 25 ng / mL ¹²⁵I-labeled, TNF α which, with respect to its receptor binding property, was not distinguishable from unlabeled TNF α . At time zero, a 1000-fold excess of unlabeled TNF α was added, and small samples of 60 μ L were taken at different times. These samples were placed into Millipore 0.22 μ MC filter units which already contained 20 μ L of a 50% suspension of 'Protein G Sepharose 4 Fast Flow Beads' ("sepharose beads") in PBS with 1% fetal calf serum. To ensure that p75sTNFR / IgG and p75sTNFR can bind to the sepharose beads, these beads had been coated earlier with an antibody directed against the TNF receptor (1 mg of antibody / mL of sepharose beads). After an incubation time of 4 min with shaking, the filtration units were centrifuged (13000 rpm, 30 sec), thus separating the unbound TNF α , while the TNF α bound to p75sTNFR-IgG and p75s TNFR adhered to the sepharose beads. This made it possible to measure the quantity of radioactively labeled TNF α that was still bound to p75sTNFR-IgG and p75sTNFR at a given time. Nonspecific binding was determined in the same manner in the

Exhibit B

absence of p75s TNFR / IgG and p75sTNFR. 100% binding was determined in the absence of unlabeled TNF α . The experiments were carried out at 25°C.

Experiment II:

Mononuclear cells were isolated from fresh venous human blood of healthy donors by means of a Ficoll Paque density gradient separator (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in a citrate buffer. These white blood cells were washed twice with a phosphate-buffered physiological saline solution and cultured at a density of 1.0×10^6 cells / mL in RPMI 1640 culture medium which had been supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 units / mL penicillin, 100 μ g / mL streptomycin, and 2 mM glutamine. For the proliferation test, the cells were cultured in flat bottom microtiter plates (NUNCLON 1-67008; Roskilde, Denmark) in 100 μ L medium. The cells were stimulated with phytohemagglutinin (Wellcome, Dartford, England) at previously determined optimum concentrations in a range from 0.5 to 1.5 μ g / mL. At the time the culture was started (day 0), p75sTNFR / IgG and p75sTNFR, respectively, up to a concentration of 10 μ g / mL were added. The culture medium was renewed after 3, 4, and 6 days. The cell proliferation was measured after 7 days; 6 hours prior to harvesting with the LKB cell harvester, 1 μ Ci of methyl- 3 H-thymidine (1 mCi / ml, Amersham, Buckinghamshire, England) per culture was added. The radioactivity incorporated into the cells was measured in a betaplate liquid scintillation counter (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The values recorded are the mean value of three cultures.

[handwritten:]

New Haven, October 8, 2001

[signature of W. Lesslauer]